

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-69192

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)3月8日

C 12 P 19/44

8214-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全3頁)

⑮ 発明の名称 酵素を用いたグリコシドの製造方法

⑯ 特 願 昭63-219785

⑰ 出 願 昭63(1988)9月2日

⑱ 発 明 者 渡 徹 茨城県鹿島郡波崎町土合本町1丁目8762-23

⑲ 発 明 者 横 道 秀 季 茨城県鹿島郡波崎町土合本町1丁目8762-23

⑳ 発 明 者 中 村 和 広 茨城県鹿島郡波崎町土合本町1丁目8762-23 花王社宅1-105

㉑ 出 願 人 花 王 株 式 会 社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号

㉒ 代 理 人 弁 理 士 古 谷 馨

明 細 書

1. 発明の名称

酵素を用いたグリコシドの製造方法

2. 特許請求の範囲

ガラクトース又は2糖以上の糖類で非還元性末端にガラクトースを含む糖類を糖供与体とし、直鎖、分岐または脂肪族のアルコール類を糖受容体として、水系および/または有機溶媒水溶液系においてβ-ガラクトシダーゼを用いて反応させてグリコシドを得ることを特徴とするグリコシドの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は酵素による有用な界面活性能および生理活性能を有するグリコシドの製造に関する。(従来の技術およびその問題点)

配糖体系界面活性剤としてアルキルサッカライド類が知られているが、このアルキルサッカライドの機能として高気泡性、高洗浄性、高泡安定性、低刺激性、高生分解性などが上げられ

注目されている。

しかし、これらアルキルサッカライド類の化学合成法による製造においては、反応選択性が低いこと、反応が多段階であること、副生物を与える場合が多いことなどの問題点があり、得られた生成物を製品に配合する場合その製品の品質に大きな影響を及ぼす可能性がある。

一方酵素合成法では、反応が選択的に行われること、反応が1段階であること、副生成物が少ないことなどの利点がある。このような酵素合成法は種々検討されており、例えば、糖供与体としてアリアルグリコシドを用い、有機溶媒水溶液中でグリコシダーゼのトランスグリコシデーションを利用する方法が提案されている(特公昭59-28400)。しかし、アリアルグリコシドを糖供与体として用いた場合アリアルグリコシドが工業的生産レベルでのコストが非常に高くなること、及びアリアルグリコシドが物性的に不安定で分解し易いことなどの難点がある。(問題点を解決するための手段)

したがって、本発明は有用な界面活性能および生理活性能を有するグリコシドを水系および／または有機溶媒水溶液系で酵素により製造する方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、上述した状況に鑑み酵素を利用したグリコシドの合成を鋭意研究した結果、酵素を用い糖供与体として単糖および／または2糖以上の糖類を用いることにより本発明を完成するに至った。

即ち本発明はガラクトース又は2糖以上の糖類で非還元性末端にガラクトースを含む糖類を糖供与体とし、直鎖、分岐または脂肪族のアルコール類を糖受容体として、水系および／または有機溶媒水溶液系においてβ-ガラクトシダーゼを用いて反応させてグリコシドを得ることを特徴とするグリコシドの製造方法を提供するものである。

本発明において非還元性末端とは多糖類分子において、その構成単糖の還元基が遊離していない方の末端をいう。

一ゼは、有機溶媒中で完全に失活しない物であれば如何なる起源のものでもよいが糖転移活性の高いものが好ましくアスペルギルスオリザエ(*Aspergillus oryzae*)、クリイペロマイセスラクチス(*Kluyveromyces lactis*)などを起源とするβ-ガラクトシダーゼなどが挙げられる。

本発明において、糖供与体、すなわち単糖以上の糖類が非還元末端にガラクトースを含む糖類と、糖受容体であるアルコール類との反応割合は糖類1molに対しアルコール類1mol以上、望ましくは、1:5-1:50である。

本発明の反応に於て有機溶媒水溶液系に使用できる有機溶媒としては、アセトニトリル、アセトン、ジオキサン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、酢酸エチル、四塩化炭素、ベンゼン、クロロホルム、ヘキサンなどがある。

反応は反応系に糖が溶解するのに必要な水分の存在下で行なうのが望ましい。水分は全反応系に対して10~70%、好ましくは20~55%程度

以下に本発明を詳しく説明する。

本発明では水系および／または有機溶媒水溶液系において酵素を使用することによりグリコシドを製造することができる。本発明に於て糖供与体として用いられる非還元末端にガラクトースを含む糖類としては次の様なものがある。

単糖…ガラクトース

2糖…ラクトース、カラビオース、ラクトサミンなど

3糖以上…ノイラミンラクトース、ラクトーH-チトラオース、アガロース、ガラクタン、カラギーナン

また、糖受容体として用いるアルコール類は第1級、第2級、第3級アルコールおよび2価以上のアルコール類である。例えば、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、オクタノール、n-デカノール、シクロヘキサノール、グリセロール、ベンジルアルコールなどが挙げられる。

本発明に用いる酵素であるβ-ガラクトシダーゼ

がよい。

また、反応pHは通常3-9の間で選択すれば良いが、アスペルギルスオリザエのβ-ガラクトシダーゼを使用する場合は、pH5.0付近で反応させるのが望ましい。反応時間は、通常3-500分であり、反応温度は5-70℃である。

(実施例)

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

#### 実施例1

(ラクトースとシクロヘキサノールよりシクロヘキシル-β-D-ガラクトシドの合成)

ラクトース1.80g(5mmol)を0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH5.0)11mlに溶解し、これにシクロヘキサノール15.0gとアセトニトリル10.0gを加え、上記リン酸緩衝液1mlにアスペルギルスオリザエ由来のβ-ガラクトシダーゼ(シグマ社製)20mg(105U)を溶解したものを加え、攪拌し、30℃で3時間反応させた。これに、メタノールを20ml加え酵素を沈澱させ遠心分離し

液層を凍結乾燥させ、トリメチルシリル化し、ガスクロマトグラフィーおよびGC-MASによりシクロヘキシル-β-D-ガラクトシドの生成を確認した。

#### 実施例 2

〔ラクトースと n-デシルアルコールより n-デシル-β-D-ガラクトシドの合成〕

ラクトース1.80 g (5 mmol) を0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH5.0) 36 ml に溶解し、これに n-デシルアルコール23.7 g とアセトニトリル 10.0 g を加え、上記リン酸緩衝液0.1 ml にアスペルギルスオリザエ由来のβ-ガラクトシダーゼ20 mg (106U) を溶解したものを加え激しく攪拌し、30℃で20時間反応させた。これに、酢酸エチル50 ml と水40 ml を加えよく混合し、静置後上層を分取し、有機溶媒をトッピングし、得られた固形物をクロロホルム-メタノールの8:2の混合溶媒にてシリカゲルカラムにかけ、n-デシル-β-D-ガラクトシド相当分画を得た。これをロータリーエバポレーターにかけ溶

媒を留去して得られた固形物をトリメチルシリル化し、ガスクロマトグラフィー及びGC-MAS にかけて n-デシル-β-D-ガラクトシドの生成を確認した。得られた生成物は0.1 g であり、モル収率5.6 %であった。

#### 実施例 3

〔ガラクトースとシクロヘキサノールよりシクロヘキシル-β-D-ガラクトシドの合成〕

ガラクトース0.90 g (5 mmol) を0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH5.0) 11 ml に溶解し、これにシクロヘキサノール15.0 g とアセトニトリル 10.0 g を加え、上記リン酸緩衝液1 ml にアスペルギルスオリザエ由来のβ-ガラクトシダーゼ20 mg (106U) を溶解したものを加え、攪拌し、30℃で3時間反応させた。これに、メタノールを20 ml 加え、酵素を沈澱させ、遠心分離し、液層を凍結乾燥させ、トリメチルシリル化しガスクロマトグラフィーおよびGC-MAS によりシクロヘキシル-β-D-ガラクトシドの生成を確認した。

#### 実施例 4

〔ガラクトースと n-デシルアルコールより n-デシル-β-D-ガラクトシドの合成〕

ガラクトース0.90 g (5 mmol) を0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH5.0) 36 ml に溶解し、これに n-デシルアルコール23.7 g とアセトニトリル 10.0 g を加え、上記リン酸緩衝液0.1 ml にアスペルギルスオリザエ由来のβ-ガラクトシダーゼ20 mg (106U) を溶解したものを加え、30℃で20時間反応させた。これに、酢酸エチル50 ml と水40 ml を加えよく混合し、静置後上層を分取し、有機溶媒をトッピングし得られた固形物をクロロホルム-メタノールの8:2の混合溶媒にてシリカゲルカラムにかけ n-デシル-β-D-ガラクトシド相当分画をロータリーエバポレーターにかけ、溶媒を留去した。得られた固形物をトリメチルシリル化しガスクロマトグラフィーおよびGC-MAS にかけて n-デシル-β-D-ガラクトシドの生成を確認した。

Partial Translation of Japanese Laid-Open Patent Publication No. 2-69192

Date of Laid-Open: March 8, 1990

Application No. 63-219785

Filing date: September 2, 1988

Applicant: Kao Corporation

Inventors: Tohru Watari et al.

Title of the Invention:

A method for producing a glycoside by using an enzyme

Claim:

1. A method for producing a glycoside comprising reacting galactose or a di- or more saccharide containing galactose at its nonreducing end, as a sugar donor, with a straight- or branched-chain aliphatic alcohol, as a sugar acceptor, by using  $\beta$ -galactosidase in an aqueous solution and/or an aqueous solution containing an organic solvent.

Page 2, upper right column, lines 2 to 14

According to the present invention, by using  $\beta$ -galactosidase in an aqueous solution and/or an aqueous solution containing an organic solvent, the glycoside can be produced. The saccharide containing galactose at its nonreducing end, which is used as a sugar donor, includes the followings:

monosaccharide --- galactose

disaccharide --- lactose, xylobiose, lactosamine etc.

tri- or more saccharide --- neuraminlactose, lacto-N-tetraose, agarose, galactan, carrageenan

Page 2, lower right column, lines 10 to 12

Example 1

[Synthesis of cyclohexyl- $\beta$ -D-galactoside from lactose and cyclohexanol]

Page 3, upper left column, lines 5 to 7

Example 2

[Synthesis of n-decyl- $\beta$ -D-galactoside from lactose and n-decyl alcohol]

Page 3, upper right column, lines 6 to 8

Example 3

[Synthesis of cyclohexyl- $\beta$ -D-galactoside from galactose and cyclohexanol]

Page 3, lower left column, lines 1 to 3

Example 4

[Synthesis of n-decyl- $\beta$ -D-galactoside from galactose and n-decyl alcohol]

## ⑫ 公開特許公報(A) 平2-69192

⑬ Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)3月8日

C 12 P 19/44

8214-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全3頁)

⑮ 発明の名称 酵素を用いたグリコシドの製造方法

⑯ 特 願 昭63-219785

⑰ 出 願 昭63(1988)9月2日

⑱ 発 明 者 渡 徹 茨城県鹿島郡波崎町土合本町1丁目8762-23  
 ⑱ 発 明 者 横 道 秀 季 茨城県鹿島郡波崎町土合本町1丁目8762-23  
 ⑱ 発 明 者 中 村 和 広 茨城県鹿島郡波崎町土合本町1丁目8762-23 花王社宅1-105  
 ⑲ 出 願 人 花 王 株 式 会 社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号  
 ⑳ 代 理 人 弁 理 士 古 谷 馨

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

酵素を用いたグリコシドの製造方法

## 2. 特許請求の範囲

ガラクトース又は2糖以上の糖類で非還元性末端にガラクトースを含む糖類を糖供与体とし、直鎖、分枝または脂肪族のアルコール類を糖受容体として、水系および/または有機溶媒水溶液系においてβ-ガラクトシダーゼを用いて反応させてグリコシドを得ることを特徴とするグリコシドの製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は酵素による有用な界面活性能および生理活性能を有するグリコシドの製造に関する。(従来の技術およびその問題点)

配糖体系界面活性剤としてアルキルサッカライド類が知られているが、このアルキルサッカライドの機能として高気泡性、高洗浄性、高泡安定性、低刺激性、高生分解性などが上げられ

注目されている。

しかし、これらアルキルサッカライド類の化学合成法による製造においては、反応選択性が低いこと、反応が多段階であること、副生物を与える場合が多いことなどの問題点があり、得られた生成物を製品に配合する場合その製品の品質に大きな影響を及ぼす可能性がある。

一方酵素合成法では、反応が選択的に行われること、反応が1段階であること、副生成物が少ないことなどの利点がある。このような酵素合成法は種々検討されており、例えば、糖供与体としてアリアルグリコシドを用い、有機溶媒水溶液中でグリコシダーゼのトランスグリコシレーションを利用する方法が提案されている

(特公昭59-28400)。しかし、アリアルグリコシドを糖供与体として用いた場合アリアルグリコシドが工業的生産レベルでのコストが非常に高くなること、及びアリアルグリコシドが物性的に不安定で分解し易いことなどの難点がある。(問題点を解決するための手段)

したがって、本発明は有用な界面活性能および生理活性能を有するグリコシドを水系および/または有機溶媒水溶液系で酵素により製造する方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、上述した状況に鑑み酵素を利用したグリコシドの合成を鋭意研究した結果、酵素を用い糖供与体として単糖および/または2糖以上の糖類を用いることにより本発明を完成するに至った。

即ち本発明はガラクトース又は2糖以上の糖類で非還元性末端にガラクトースを含む糖類を糖供与体とし、直鎖、分岐または脂肪族のアルコール類を糖受容体として、水系および/または有機溶媒水溶液系において $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いて反応させてグリコシドを得ることを特徴とするグリコシドの製造方法を提供するものである。

本発明において非還元性末端とは多糖類分子において、その構成単糖の還元基が遊離していない方の末端をいう。

一ゼは、有機溶媒中で完全に失活しない物であれば如何なる起源のものでもよいが糖転移活性の高いものが好ましくアスペルギルスオリザエ(*Aspergillus oryzae*)、クレイベロマイセスラクチス(*Kluyveromyces lactis*)などを起源とする $\beta$ -ガラクトシダーゼなどが挙げられる。

本発明において、糖供与体、すなわち単糖以上の糖類が非還元末端にガラクトースを含む糖類と、糖受容体であるアルコール類との反応割合は糖類1molに対しアルコール類1mol以上、望ましくは、1:5-1:50である。

本発明の反応に於て有機溶媒水溶液系に使用できる有機溶媒としては、アセトニトリル、アセトン、ジオキサン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、酢酸エチル、四塩化炭素、ベンゼン、クロロホルム、ヘキサンなどがある。

反応は反応系に糖が溶解するのに必要な水分の存在下で行なうのが望ましい。水分は全反応系に対して10~70%、好ましくは20~55%程度

以下に本発明を詳しく説明する。

本発明では水系および/または有機溶媒水溶液系において酵素を使用することによりグリコシドを製造することができる。本発明に於て糖供与体として用いられる非還元末端にガラクトースを含む糖類としては次の様なものがある。

単糖…ガラクトース

2糖…ラクトース、カラビオース、ラクトサミンなど

3糖以上…ノイラミンラクトース、ラクト-N-テトラオース、アガロース、ガラクトサン、カラギーナン

また、糖受容体として用いるアルコール類は第1級、第2級、第3級アルコールおよび2価以上のアルコール類である。例えば、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、オクタノール、n-デカノール、シクロヘキサノール、グリセロール、ベンジルアルコールなどが挙げられる。

本発明に用いる酵素である $\beta$ -ガラクトシダ

がよい。

また、反応pHは通常3-9の間で選択すれば良いが、アスペルギルスオリザエの $\beta$ -ガラクトシダーゼを使用する場合は、pH5.0付近で反応させるのが望ましい。反応時間は、通常3-500分であり、反応温度は5-70℃である。

(実施例)

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

#### 実施例1

(ラクトースとシクロヘキサノールよりシクロヘキシル- $\beta$ -D-ガラクトシドの合成)

ラクトース1.80g(5mmol)を0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH5.0)11mlに溶解し、これにシクロヘキサノール15.0gとアセトニトリル10.0gを加え、上記リン酸緩衝液1mlにアスペルギルスオリザエ由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ(シグマ社製)20mg(106U)を溶解したものを加え、攪拌し、30℃で3時間反応させた。これに、メタノールを20ml加え酵素を沈澱させ遠心分離し

液層を凍結乾燥させ、トリメチルシリル化し、ガスクロマトグラフィーおよびGC-MASによりシクロヘキシル-β-D-ガラクトシドの生成を確認した。

#### 実施例2

〔ラクトースと n-デシルアルコールより n-デシル-β-D-ガラクトシドの合成〕

ラクトース1.80g (5mmol) を0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH5.0) 36ml に溶解し、これに n-デシルアルコール23.7g とアセトニトリル10.0g を加え、上記リン酸緩衝液0.1 ml にアスベルギルスオリザエ由来のβ-ガラクトシダーゼ20mg (106U) を溶解したものを加えよく攪拌し、30℃で20時間反応させた。これに、酢酸エチル50ml と水40ml を加えよく混合し、静置後上層を分取し、有機溶媒をトッピングし、得られた固形物をクロロホルム-メタノールの8:2の混合溶媒にてシリカゲルカラムにかけ、n-デシル-β-D-ガラクトシド相当分画を得た。これをロータリーエバポレーターにかけ溶

媒を留去して得られた固形物をトリメチルシリル化し、ガスクロマトグラフィー及びGC-MAS にかけて n-デシル-β-D-ガラクトシドの生成を確認した。得られた生成物は0.1g であり、モル収率5.6%であった。

#### 実施例3

〔ガラクトースとシクロヘキサノールよりシクロヘキシル-β-D-ガラクトシドの合成〕

ガラクトース0.90g (5mmol) を0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH5.0) 11ml に溶解し、これにシクロヘキサノール15.0g とアセトニトリル10.0g を加え、上記リン酸緩衝液1 ml にアスベルギルスオリザエ由来のβ-ガラクトシダーゼ20mg (106U) を溶解したものを加え、攪拌し、30℃で3時間反応させた。これに、メタノールを20ml 加え、酵素を沈殿させ、遠心分離し、液層を凍結乾燥させ、トリメチルシリル化しガスクロマトグラフィーおよびGC-MAS によりシクロヘキシル-β-D-ガラクトシドの生成を確認した。

#### 実施例4

〔ガラクトースと n-デシルアルコールより n-デシル-β-D-ガラクトシドの合成〕

ガラクトース0.90g (5mmol) を0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH5.0) 36ml に溶解し、これに n-デシルアルコール23.7g とアセトニトリル10.0g を加え、上記リン酸緩衝液0.1 ml にアスベルギルスオリザエ由来のβ-ガラクトシダーゼ20mg (106U) を溶解したものを加え、30℃で20時間反応させた。これに、酢酸エチル50ml と水40ml を加えよく混合し、静置後上層を分取し、有機溶媒をトッピングし得られた固形物をクロロホルム-メタノールの8:2の混合溶媒にてシリカゲルカラムにかけ n-デシル-β-D-ガラクトシド相当分画をロータリーエバポレーターにかけ、溶媒を留去した。得られた固形物をトリメチルシリル化しガスクロマトグラフィーおよびGC-MAS にかけて n-デシル-β-D-ガラクトシドの生成を確認した。

出願人代理人 古 谷 肇



**(54) PRODUCTION OF GLUCOSE**

(11) 2-69190 (A) (43) 8.3.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-219583 (22) 1.9.1988  
 (71) NITTO DENKO CORP. (72) HIROKO SAHASHI(2)  
 (51) Int. Cl. C12P19 14, C12N11 02

**PURPOSE:** To produce glucose in high purity and efficiency by the multi-stage saccharification reaction of liquefied starch using an immobilized enzyme reactor produced by immobilizing glucoamylase and a debranching enzyme on a porous layer

**CONSTITUTION:** (A) An immobilized enzyme membrane reactor is produced by bonding (B) a glucoamylase originated from microorganism of genus *Rhizopus*, etc., and (C) a debranching enzyme such as pullulanase originated from microorganism of genus *Bacillus*, etc., through covalent bond to (D) an anisotropic ultrafiltration membrane composed of a dense layer of a membrane material such as polysulfone having a fractional molecular weight of 1,000-1,000,000 and a porous layer having pore diameter of 0.1-100  $\mu$ m and integrated with the dense layer. The immobilization ratio of C/B is 1.6-2 and the amount of the enzymes B and C is 0.1-2mg per 1cm<sup>2</sup> of the membrane A. A liquefied starch originated from barley, etc., and having a DE (weight ratio of the reducing sugar defined by the formula) of 5-20 is passed through the reactor A under pressure and subjected to multi-stage saccharification reaction to produce the objective glucose.

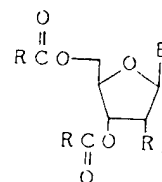
$$\frac{[\text{weight of direct reducing sugar (in terms of glucose)}]}{\text{total solid content}} \times 100$$

**(54) DEACYLATION OF NUCLEOSIDES**

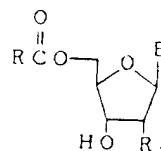
(11) 2-69191 (A) (43) 8.3.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-222059 (22) 5.9.1988  
 (71) TAIHO YAKUHIN KOGYO K.K. (72) ATSUSHIKO KAMIMURA(3)  
 (51) Int. Cl. C12P19/38

**PURPOSE:** To selectively and easily produce a deacylated nucleoside with simple process by reacting nucleosides with lipase or protease.

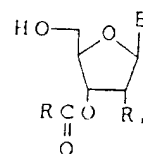
**CONSTITUTION:** (A) A nucleoside of formula I (B is substituted or unsubstituted nucleic acid base such as uracil; R<sub>1</sub> is H or -OCOR; R is alkyl or substituted or unsubstituted phenyl) is dissolved in an aqueous mixed solvent containing 10-50wt.% of a polar solvent (e.g., pyridine) to obtain (B) a solvent system. The component B is added with (C) a lipase originated from microbial strain of genus *Pseudomonas*, etc., or (D) a protease originated from microbial strain of genus *Rhizopus*, etc., in an amount of 20-300g per 1mol of the component A and the components are made to react with each other in the presence of a buffering agent at pH6.5-7.5 and 10-60°C for 0.5hr-2 days to obtain (E) a reaction product. The component E is extracted and purified to obtain a deacylated compound such as a compound of formula II (R<sub>2</sub> is H or OH) as a reaction product of the enzyme C or a compound of formula III, etc., as a reaction product of the enzyme D



I



II



III

**(54) PRODUCTION OF GLYCOSIDE USING ENZYME**

(11) 2-69192 (A) (43) 8.3.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-219785 (22) 2.9.1988  
 (71) KAO CORP. (72) TORU WATARI(2)  
 (51) Int. Cl. C12P19/44

**PURPOSE:** To obtain a glycoside having surface activity and physiological activity by reacting a specific sugar donor and a sugar acceptor composed of a straight-chain aliphatic alcohol, etc., with  $\beta$ -galactosidase in an aqueous system and/or an aqueous solution of an organic solvent.

**CONSTITUTION:** A sugar donor (A) is selected from disaccharides or polysaccharides having galactose at the non-reducing terminal (e.g., galactose, lactose, etc.). A sugar acceptor (B) is selected from straight-chain, branched-chain or aliphatic alcohols such as methanol. A  $\beta$ -galactosidase (C) originated from *Aspergillus oryzae* is selected to obtain a component C having high sugar transition activity and resistant to inactivation in organic solvent. The components A and B are dissolved at a molar ratio of 1:(5-50) in an aqueous system having a water-content of 10-70wt.% or in an aqueous solution of an organic solvent such as acetone to obtain a solution D. The component C is added to the component D and made to react at about pH5 and 5-70°C for 3-500min to produce the objective glucoside.

**(54) PRODUCTION OF L-ALANINE**

(11) 2-242690 (A) (43) 27.9.1989 (19) JP  
 (21) Appl. No. 64-62088 (22) 16.3.1989  
 (71) MITSUBISHI PETROCHEM CO LTD (72) MASATO TERASAWA(3)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup> C12P13 06 (C12P13 06, C12R1 38)

**PURPOSE:** To produce L-alanine in high yield without manifesting racemase activity by enzymatically reacting L-aspartic acid in the presence of a bacterium cell having enzymatic activity while maintaining pH 4.3-5.0 and 40-47°C.

**CONSTITUTION:** *Pseudomonas dacunhae* IAM1152 strain containing L-aspartic acid  $\beta$ -decarboxylase is aerobically cultured in a medium containing a carbon source such as fumaric acid, a nitrogen source such as ammonium and an inorganic salt useful for ordinary microorganisms and the prepared cell is used for enzymatic reaction. Then an aqueous solution containing L-aspartic acid or a salt thereof is adjusted to proper pH in the presence of the bacterium cell and subjected to enzymatic reaction at pH 4.3-5.0 at 40-47°C. Then separation and purification of formed alanine in the reaction solution can be carried out by well-known ion exchange resin treatment, etc.

**(54) PRODUCTION OF BETACYANIN-BASED DYESTUFF BY CULTURED CELL**

(11) 2-242691 (A) (43) 27.9.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 64-61470 (22) 14.3.1989  
 (71) SOMAR CORP (72) YUMIKO MURATA(3)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup> C12P17/12, C09B61/00, C12P19/60//C12N5/04(C12P17/12, C12R1/91)(C12P19/60, C12R1/91)

**PURPOSE:** To efficiently produce a betacyanin-based dyestuff having stable quality by culturing a callus derived from a plant of *Beta vulgaris* L. forming a betacyanin-based dyestuff in a liquid medium containing a reducing agent.

**CONSTITUTION:** A callus containing a betacyanin-based dyestuff derived from a plant of *Beta vulgaris* L. forming a betacyanin-based dyestuff such as red beet or table beet, representatively Detroit dark red is multiplied in Murashige-Skoog medium. The callus is cultured in a liquid medium containing a reducing agent to produce a betacyanin-based dyestuff. Glutathione, ascorbic acid, sodium sulfite, etc., may be cited as the concrete example of the above-mentioned reducing agent and the amount of the reducing agent used is usually 0.1-100ppm, preferably 0.5-50ppm calculated as concentration in the medium.

**(54) PRODUCTION OF GLYCOSIDE**

(11) 2-242692 (A) (43) 27.9.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 64-64497 (22) 16.2.1989  
 (71) KAO CORP (72) KATSUMI KITA(3)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup> C12P19/44, C07H15/04

**PURPOSE:** To facilitate enzymatic reaction between a liposoluble alcohol and a saccharide and to efficiently produce a glycoside by subjecting the liposoluble alcohol and the saccharide to enzymatic reaction using an amphipathic compound to both the substances.

**CONSTITUTION:** A solvent which is an amphipathic solvent to bath a liposoluble alcohol and a saccharide is blended with 0.01-20wt.%, preferably 0.5-5wt.% (based on the solvent) of the liposoluble alcohol and the saccharide, which are subjected to enzymatic reaction to give a glycoside. Monoethylene glycol, diethylene glycol or polyethylene glycol may be cited as the concrete example of the solvent. Methanol, ethanol, propanol, butanol, pentanol, etc., may be cited as the concrete example of the alcohol. A preferable example of the enzyme used in the enzymatic reaction is  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase or glucoamylase.